

不同发育时期少突胶质细胞胞膜 Nogo-A 的表达*

熊南翔¹ 赵洪洋^{1,2} 张方成¹

摘要 目的:探讨少突胶质细胞在发育过程中胞膜表达 Nogo-A 量的变化。**方法:**以 A2B5、O4、O1、MBP 为不同发育时期的少突胶质细胞的标志物,分别以抗上述标志物的抗体标记少突胶质细胞,流式细胞术分选,每组收集相同数目的细胞,再分离出每组细胞的胞膜蛋白质,Western-blot 半定量检测每个细胞组 Nogo-A 蛋白的表达情况。**结果:**Western-blot 检测结果显示,每组在 200kDa 处出现阳性蛋白条带,A2B5 组蛋白量最高,其次是 O4、O1 组,MBP 组蛋白含量最低。**结论:**在发育过程中,少突胶质细胞胞膜表面的 Nogo-A 蛋白的量逐渐降低。

关键词 Nogo-A;少突胶质细胞;胞膜;表达

中图分类号: R338.2,R49 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-04-0293-03

Expression of Nogo-A in membrane of oligodendrocytes in different developmental stages/XIONG Nanxiang, ZHAO Hongyang, ZHANG Fangcheng//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007,22(4):293-295

Abstract Objective:To explore changes of Nogo-A expression in membrane of oligodendrocytes in different developmental stages.**Method:** A2B5、O4、O1、MBP were used as markers of oligodendrocyte lineages,the same numbers of oligodendrocytes in each group were sorted by flow cytometry,after withdrawing membrane protein and the expression of Nogo-A in each group were analysed by Western-blot method. **Result:**There were positive protein straps near 200kDa in each group, and the protein content in group A2B5 was the highest, in group O4、O1 were less and in group MBP was the lowest. **Conclusion:**The expression of Nogo-A protein in membrane declined gradually in the development course of oligodendrocyte.

Author's address Dept. of Neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan, 430022

Key words Nogo-A; oligodendrocyte; membrane; expression

Nogo-A 蛋白是一种抑制中枢神经轴突生长的因子,在各类神经元中有少量表达,主要表达在少突胶质细胞中,现研究发现 Nogo-A 和它的受体 NgR 与中枢神经系统的发育有关,在成熟少突胶质细胞内,Nogo-A 主要定位在胞浆,仅有少量定位在细胞膜上^[1-2],而 NgR 定位于神经元胞膜上,在发育期,是否有更多的 Nogo-A 蛋白表达于少突胶质细胞膜以利于同受体 NgR 相互作用?为了探讨这个问题,本研究用少突胶质细胞发育过程的标志物标记不同发育时期的少突胶质细胞,采用流式细胞术筛选,检测了相同数目不同发育时期的少突胶质细胞胞膜上的 Nogo-A 表达量,结果如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Wistar 大鼠由同济医学院实验动物中心提供,胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM-F12 购自 Gibco 公司,流式细胞仪(FACS 型)由美国 BD 公司生产,胞浆膜蛋白分离试剂盒购自 Biovision 公司;羊抗 Nogo-A 多克隆抗体购自 Santa-Cruz 公司,鼠抗 A2B5、O4 和

O1 单克隆抗体由美国佐治亚州立大学 Deborah Baro 教授惠赠,鼠抗 MBP 单克隆抗体购自 Abcam 公司,FITC 标记的兔抗鼠 IgG 购自 pierce 公司,辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊 IgG 购自北京中杉公司。

1.2 少突胶质细胞系的获取

选择出生 10d 的健康 Wistar 大鼠 15 只,雌雄不拘,无菌条件下取出大脑皮质,置入 D-Hank's 液中,在立体显微镜下剔除脑膜及血管组织,分离出大脑皮质,剪成 1mm³ 的组织块,在 0.125% 的胰蛋白酶中 37℃ 消化 15min,用含有血清的培养基终止消化,轻轻吹打使细胞分散成单个细胞,1000r/min 离心 10min,弃上清,加入培养基(含 10% 胎牛血清,

* 基金项目:国家自然科学基金资助(30471775);湖北省自然科学基金资助(2005AA301C15)

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科,湖北武汉,430022

2 通讯作者:赵洪洋(华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科,湖北武汉,430022)

作者简介:熊南翔,男,讲师,主治医师,博士

收稿日期:2006-07-24

DMEM-F12), 使细胞充分分离, 行贴壁处理以除去纤维细胞, 然后用快速离心法去除胞体较大的神经元细胞, 将获得的细胞行 A2B5 标记; 取出生后 16d 的健康 Wistar 大鼠 30 只, 雌雄不拘, 与上同样的方法分离细胞, 将获得的细胞行 O4 和 O1 标记, 选成年 Wistar 大鼠, 分离细胞步骤同前, 获得细胞作 MBP 标记。

1.3 间接免疫荧光染色

向流式细胞分选专用试管加入大约 10^8 个数量的混合细胞, 将试管置于水平离心机中, 以 1000r/min 离心 5min, 弃上清液; 离心振摇试管, 使细胞完全分散, 0.1% Triton-X-100 作破膜处理, 然后每管加入 500 μ l 稀释的一抗溶液 (A2B5, 1:500), 混匀, 置 4 $^{\circ}$ C 下反应 30min; 取出试管, 每管加入 5—8ml 预冷至 4 $^{\circ}$ C 的含 5% FCS 的 PBS, 混匀, 以 1000r/min 离心 5min, 弃上清液, 反复洗涤 2—3 次; 轻摇试管使细胞分散, 每管加入 500 μ l 的 FITC 标记的二抗 (1:200), 混匀, 置 4 $^{\circ}$ C 反应 30min; 取出试管, 每管加入 5—8ml 预冷至 4 $^{\circ}$ C 的含 5% FCS 的 PBS, 混匀, 以 1000r/min 离心 5min, 弃上清液, 反复洗涤 2—3 次; 每管加入约 5ml PBS, 悬浮细胞, 移入专用测试管。标记 O4、O1、MBP 的步骤与上相同。

1.4 流式细胞术分选不同标记的少突胶质细胞

流式细胞仪检测前先以标准荧光微球调整仪器, 使变异系数在 2% 以内, 并进行荧光补偿调节。氩离子激发光波长为 488nm, 散射光带通过滤片 FITC 为 (530 \pm 10)nm。每组收集 10^6 万个细胞, 荧光强

度以对数放大, 计算机上打印出直方图。

1.5 提取胞浆膜蛋白和 Western-blot 分析

将分选得到的各组细胞按照说明书上操作提取胞浆膜蛋白, 将所获蛋白上样, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 通过电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至 NC 膜 (硝酸纤维素膜) 上, NC 膜在含 5% 脱脂奶粉的 PBS 中 37 $^{\circ}$ C 封闭 90min, 一抗加入羊抗 Nogo-A 多克隆抗体 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 漂洗 (10min \times 3 次), 二抗加入辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊 IgG (1:200), 37 $^{\circ}$ C 作用 40min, PBS 漂洗 (10min \times 3 次), 增强化学发光法 (ECL) 显色后照相, 观察显影蛋白条带的相对分子质量。采用分析软件比较各样本蛋白条带的显影强度, 以显影相对强度作为蛋白表达的计量标准。

2 结果

2.1 流式细胞术分选细胞的结果

每组收集相同数目的细胞 (10^6), 图 1 为流式细胞术分选完成后的直方图结果。

2.2 Western-blot 分析的结果

结果显示在相对分子质量 200000Da 处, A2B5、O1、O4、MBP 细胞组均可见阳性条带 (图 2), 鼠源 Nogo-A 蛋白的分子量为 200000Da, 表明每组细胞的胞膜上都有 Nogo-A 蛋白的表达, 分析软件比较各样本蛋白条带的显影强度, 发现 A2B5 组显影强度最高, O4 组为次, 再次为 O1 组, MBP 组显影强度最低, 对照组为阴性。

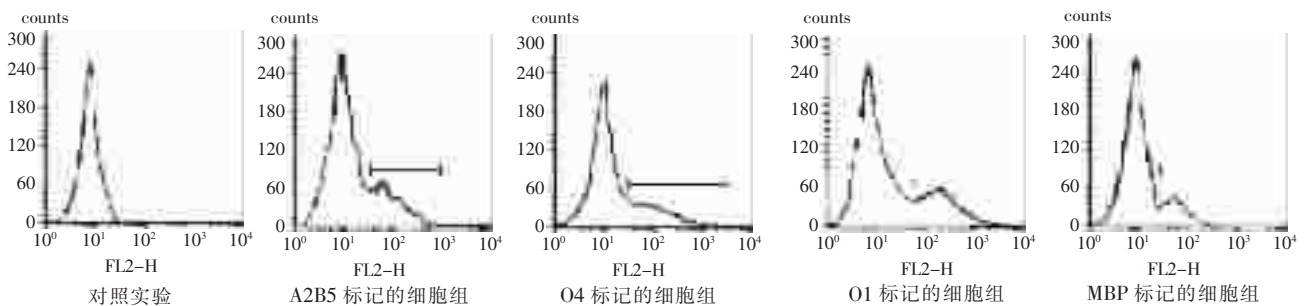


图 1 流式细胞术分选完成后的直方图

3 讨论

按发育程度和形态, 少突胶质细胞可分为三型, 但少突胶质细胞发育是一个连续的过程, 其形态、表达产物和功能的演变没有严格的界限, 因此, 其分类是相对的。1 型少突胶质细胞, 又称前 O2A (pre-O2A progenitor cell), 细胞呈圆形, 表面光滑, 具有很强的分裂增殖潜力, 表达神经节苷脂 GM1, 波形蛋白和多唾液酸—神经黏附分子 (polysialic acid—neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM) 等; 2 型少突

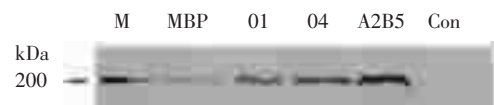


图 2 各细胞组胞膜蛋白的 Western-blot 结果

M 蛋白质分子质量标准; Con 对照组

胶质细胞, 胞体常有双极或三极突起, 极少数为单极突起, 直径约 7 μ m, 有一定的分裂增殖能力, 为双潜能细胞, 既可分化为少突胶质又可分化为 I 型星形胶质, 常用 A2B5 抗体标记 O2A, O2A 祖细胞在成年

的脊髓中也存在,主要存在于前脑的脑室下区、后脑和脊髓的腹侧区,在发育过程中,会不断地迁移;Ⅲ型少突胶质细胞,不再具有分裂增殖能力,根据其形成髓鞘的能力,又分为不成熟的和成熟的两类少突胶质。不成熟的少突胶质胞体常伸出4—5条较粗大突起,表面还残留有A2B5标志物,同时也少量表达O4和O1抗原,无形成髓鞘的能力。成熟的少突胶质突起有如蜘蛛网,大量表达髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)等,有对轴突髓鞘化的能力。

Meier^[3]研究发现 Nogo-A 在出生后 9d(P9)大鼠的少突胶质细胞中有强烈表达,而髓鞘形成在大鼠 P17 才出现,这时的少突胶质细胞才开始成熟,具有髓鞘化的能力,大量表达 MBP。在大鼠 P0 时期,体内的少突胶质细胞以 I 型少突胶质细胞为主,到了 P10 时期, II 型少突胶质细胞占主要部分,因此,本研究分别取 P10 和 P16 时期的大脑皮质,用流式细胞术分选表达 A2B5 和 O1、O4 的抗原。A2B5 除了在少突胶质细胞上有表达,还在少数不成熟神经元细胞膜上有表达,所以,在用流式细胞术分选 A2B5 阳性少突胶质细胞之前,要去除神经元成分;而 O4、O1、MBP 仅在少突胶质细胞中表达,在神经元和星型胶质细胞中并不表达,所以进行流式细胞术分选时,对用作分选的细胞群的纯度(混有神经元)不做严格要求。

Wang^[4]取出 P2 的大鼠的皮质,然后培养得到纯化的少突胶质细胞,在体外进行少突胶质细胞的分化,它以 A2B5、O1、O4、MBP 为不同发育时期少突胶质细胞的标志物,采用免疫荧光双标的方法发现,在少突胶质细胞中,A2B5、O1、O4、MBP 与 Nogo-A 有共同表达的部位,都可位于少突胶质细胞的突起和胞浆和胞核。也就是说,Nogo-A 在未成熟的少突胶质细胞中都有表达。我们知道,Nogo-A 的受体—Nogo-66 Receptor 位于神经元胞膜和胞浆中,在发育时期 Nogo-A 发挥它的功能时,要和它的受体相互作用,进行少突胶质细胞和神经元的交流,那么必须是两种细胞膜表面的接触,大约有 3.85% 的成熟的少突胶质细胞表面有 Nogo-A 表达,仅占少数,在发育早期的少突胶质细胞中胞膜上 Nogo-A 的表达量与成熟少突胶质细胞相比是否更高目前尚不清楚。本研究的结果发现,在细胞数目相同的情况下,表达 A2B5 的少突胶质细胞胞膜上 Nogo-A 的含量最高,其次是表达 O4 抗原的少突胶质细胞,再次是表达 O1 抗原的少突胶质细胞,胞膜 Nogo-A 的含量

最少的是成熟的表达 MBP 的少突胶质细胞,这表明发育早期的少突胶质细胞胞膜上 Nogo-A 的含量比晚期的高,在少突胶质细胞的发育过程中,胞膜上 Nogo-A 的表达逐渐降低。这有两种可能,一是发育早期胞膜表达 Nogo-A 的少突胶质细胞比率较晚期高,二是表达 Nogo-A 的少突胶质细胞比率不变,但单个细胞胞膜上 Nogo-A 蛋白的量更高,要明确这一点需要进一步探讨。另外,表达 A2B5 的少突胶质前体细胞可分化为成熟少突胶质细胞和星型胶质细胞,星型胶质细胞是不表达 Nogo-A 蛋白的,而分化为星型胶质细胞的那部分少突胶质前体细胞是否表达 Nogo-A 蛋白尚不清楚,但我们的结果仍然发现表达 A2B5 的少突胶质前体细胞胞膜上 Nogo-A 蛋白的量更高。

从最近有关 Nogo-A 功能研究的结果来看^[5-6],主要认为 Nogo-A 与神经系统的发育有关。本研究的结果提示在发育早期比晚期少突胶质细胞胞膜表面有更多 Nogo-A 蛋白表达,说明在发育期 Nogo-A 蛋白可以更多地和位于神经元上的受体 NgR 结合发挥作用,而且,Nogo-A 与 NgR 的作用并不一定抑制轴突生长,一定条件下也可促进轴突生长^[7],这支持了 Nogo-A 参与神经元环路的连接和神经元的可塑性的观点。

参考文献

- [1] 熊南翔,赵洪洋,张方成,等.流式细胞术分选胞膜表达 Nogo-A 的少突胶质细胞[J].医学研究生学报,2005,18(8):690—691.
- [2] Dodd DA, Niederoest B, Bloechlinger S, et al. Nogo-A, -B and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types[J]. J Biol Chem, 2005, 280(13):12494—12502.
- [3] Meier S, Brauer AU, Heimrich B, et al. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure [J]. FASEB J, 2003, 17(9):1153—1155.
- [4] Wang X, Chun SJ, Treloar H, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact[J]. J Neurosci, 2002, 22(13):5505—5515.
- [5] Al Halabiah H, Delezoide AL, Cardona A, et al. Expression pattern of NOGO and NgR genes during human development[J]. Gene Expr Patterns, 2005, 5(4):561—568.
- [6] Hasegawa T, Ohno K, Sano M, et al. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nogo-A and Nogo-receptor in the rat central nervous system[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 133(1):119—130.
- [7] Hasegawa Y, Fujitani M, Hata K, et al. Promotion of axon regeneration by myelin-associated glycoprotein and Nogo through divergent signals downstream of Gi/G [J]. J Neurosci, 2004, 24(30):6826—6832.